

ارزیابی هیستوپاتولوژی عصاره‌ی گرده‌ی گیاه لوئی بر التیام زخم تجربی تمام ضخامت در موش سوری

هادی نداف^{۱*}، صالح اسماعیل‌زاده^۲، مهدی پورمهدی‌بروجنی^۳ و سروش سایبیزا^۴

تاریخ دریافت: ۹۴/۶/۱۰

تاریخ پذیرش: ۹۵/۲/۴

چکیده

از هزاران سال پیش از گیاهان به عنوان ماده‌ی ترمیم دهنده‌ی زخم‌ها استفاده شده است. گیاه لوئی، بومی محیط‌های تالابی همچون خوزستان است و به وفور قابل دسترس و استحصال می‌باشد. هدف این مطالعه بررسی اثر التیامی عصاره‌ی گرده‌ی گیاه لوئی بر التیام زخم تمام ضخامت موش سوری است. تعداد ۲۶ سر موش سوری به ۳ گروه ۱۲ تایی شامل گروه کنترل سالین، گروه کنترل اسرین و گروه آزمایش (اسرین محتوی عصاره‌ی گرده) تقسیم شدند. پس از بیهوشی، برداشت یک قطعه پوست به ابعاد ۰/۵×۰/۵ سانتی‌متر از ناحیه‌ی پشت گردن و بین دو کتف انجام شد. موضع عمل با سرم فیزیولوژی استریل تحت درمان قرار گرفت. این پروسه درمانی برای کلیه ۱۲ سر موش پس از اجرای عملیات جراحی صورت گرفت و هر گروه به صورت روزانه یک بار درمان اختصاصی خود را دریافت کرد. به منظور تعیین مدت زمان درمان، هر یک از گروه‌ها نیز به ۳ گروه تقسیم شدند (گروه ۷ و ۱۴ و ۲۱ روز). پس از خاتمه هر دوره‌ی زمانی در هر گروه، پوست موضع زخم پس از آسان‌کشی هر موش، به همراه ۰/۵ سانتی‌متر از پوست اطراف برداشته شد و به آزمایشگاه هیستوپاتولوژی ارسال شد. در پایان مطالعه میزان سلول‌های تک هسته‌ای، چند هسته‌ای، فیبروبلاست و عروق‌زایی در گروه درمان کم‌تر از سایر گروه‌ها بود ($P < 0/001$). علی‌رغم کم‌تر بودن انقباض زخم در گروه درمان، این روند در روز ۱۴ نسبت به سایر گروه‌ها بیشتر بود ($P < 0/001$). علی‌رغم این که در گروه درمان روند انقباض زخم با شدت کم‌تری آغاز شد ولی در ادامه شدت بیش‌تری نسبت به سایر گروه‌ها داشت ($P < 0/001$). بهبودی کامل زخم در روز ۲۱ در تمامی گروه‌ها مشاهده شد. در این مطالعه، کاربرد موضعی عصاره‌ی دانه‌ی گرده‌ی لوئی تأثیر مثبتی بر مراحل ترمیم زخم در موش داشت و بنابراین شاید نقش سودمندی بر ترمیم زخم داشته باشد.

کلمات کلیدی: هیستوپاتولوژی، التیام زخم، گیاه لوئی، موش سوری

مقدمه

تیفاسا^۱ است. این گیاه در مناطق باتلاقی و مرداب‌های شمالی و جنوب غربی ایران رشد می‌کند. مطالعات نشان داده است که گرده‌ی این گیاه، حاوی اسید آمینه‌های ضروری ارگان‌ها می‌باشد (Yeung 1985). عصاره‌ی گرده‌ی گیاه لوئی در درمان التهاب حاد و مزمن در موش

التیام زخم از جمله مسائلی است که همواره تلاش‌های فراوانی در جهت دستیابی به آن صورت گرفته است. آدمی از هزاران سال پیش، از گیاهان به عنوان ترمیم-دهنده‌ی زخم‌ها استفاده می‌نمود (Duke and Ayensu 1985). گیاه لوئی^۱ یک گیاه آبزی پایدار از خانواده‌ی

(نویسنده‌ی مسئول)

E-mail: hdnaddaf@scu.ac.ir

*۱ دانشجویار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

۲ دانشجویار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

۳ دانشجویار گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

۴ دانش‌آموخته‌ی دکترای تخصصی جراحی دامپزشکی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

مواد و روش کار

گیاه لوئی از نیازهای هورالهوریزه به کمک بومیان منطقه‌ی هور جمع‌آوری گردید. سپس اقدام به جمع‌آوری دانه‌های گرده از بخش بالایی اندام‌های زاینده‌ی گیاه (اندام نر) و قرار دادن آن‌ها در یک کیسه‌ی پارچه‌ای از جنس کتان شد. به منظور تسهیل در امر حمل و دستکاری، با قرار دادن کیسه‌ی محتوی دانه‌های گرده بر بالای بخار آب عملیات خمیری شدن صورت گرفت. پس از سرد شدن خمیر به دست آمده، دانه‌های گرده به صورت ماده‌ای سفت ولی ترد و شکننده و زرد رنگ تبدیل شد. در ادامه، عصاره‌ی الکلی (الکل اتیلیک) به روش معمول به دست آمد (Sukhdev et al. 2008). برای اجرای این مطالعه، تعداد ۳۶ سر موش سوری تهیه و در قفس‌های انفرادی نگهداری شدند. سپس موش‌ها به ۳ گروه ۱۲ تایی شامل گروه کنترل سالین (سرم فیزیولوژی استریل)، گروه کنترل اسرین ۴۰۰ (ساخت شرکت دارو پخش) و گروه آزمایش (اسرین محتوی عصاره‌ی گرده به صورت پماد ۱ درصد) تقسیم شدند. در گروه کنترل سالین، پس از وزن کردن هر موش (میانگین وزن ۲۵ گرم) با توجه به دوز داروی بی‌هوشی برای موش سوری (کتامین ۵۰ mg/kg + زایلازین ۵ mg/kg) (Tranquilli et al. 2013) به صورت داخل صفاقی و با استفاده از سرنگ انسولین تزریق صورت گرفت. پس از بیهوشی، ناحیه‌ی پشت گردن و بین دو کتف حیوان به وسعت ۲/۵×۲/۵ سانتی‌متر موزنی، ضدعفونی و برای برش جراحی و برداشت یک قطعه پوست به ابعاد ۰/۵×۰/۵ سانتی‌متر آماده‌سازی شد. برای جلوگیری از اشتباه در مساحت پوست برداشته شده از شابلن با وسعت ۰/۵×۰/۵ سانتی‌متری استفاده شد. پس از برداشت پوست با تمام ضخامت (ابی‌درم و درم) موضع عمل با سرم فیزیولوژی استریل تحت درمان قرار گرفت. این پروسه‌ی درمانی برای کلیه ۱۲ سر موش پس از اجرای عملیات جراحی صورت گرفت (۱۲ سر موش هر گروه خود نیز به ۳

سوری مؤثر است (Varpe et al. 2012). همچنین تاکنون بیش از ۱۵ نوع اسید آمینه‌ی ضروری و غیرضروری در دانه‌ی گرده‌ی گیاهان متفاوت شناسایی شده است. آنچه که باعث اهمیت گرده می‌شود ترکیباتی است که در افزایش فعالیت‌های بیولوژیکی بدن دخالت دارد. اثرات هیپولپدیمیکی و ضد توموری همراه با اثرات فزاینده‌ی آن در روند پروسه‌های متابولیکی ارگان‌ها نیز گزارش شده است (Dukhanina et al. 2006). در مطالعه‌ی دیگر موادی همچون آلانتوئین^۱، کولین^۲، تری ترپنویید ساپونین^۳، مشتقات اسید روزماریک^۴ و تانیس^۵ در دانه‌ی گرده‌ی گیاه لوئی شناسایی گردیده است (Kucera et al. 2004). این گرده جهت بهبود بسیاری از بیماری‌ها و همچنین به عنوان یک ماده‌ی بیولوژیکی تحریک کننده‌ی کلیه‌ی ارگان‌های بدن کاربرد دارد (Yeung 1985). گرده‌ی این گیاه دارای ۲۸ عنصر شیمیایی مانند کلسیم، فسفر و منیزیم و اختصاصاً مقادیر زیادی پتاسیم، مس، کبالت و آهن است. گرده دارای ویتامین‌های متنوع، هورمون‌های گیاهی، محرک‌های رشد، مواد آنتی‌باکتریال و ترکیبات ضدالتهابی می‌باشد. تعدادی از مخمرهای ضروری برای متابولیسم و فرآیندهای شیمیایی بدن، در گرده یافت شده است. گرده بالاخص دارای فیتوسیت^۶ است که به حفظ گیاه در مقابل باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها کمک می‌کند (Duke and Ayensu 1985). با توجه به ویژگی‌ها و مواد متنوع و مؤثر بر ترمیم زخم که در گیاه لوئی موجود است، هدف این مطالعه، بررسی اثر التیامی عصاره‌ی گرده‌ی گیاه لوئی بر التیام زخم تجربی تمام ضخامت در موش سوری است.

- 1- Allantoin
- 2- Choline
- 3- Triterpenoid saponin
- 4- Rosmarinic acid derivatives
- 5- Tannis
- 6- phytocide



تصویر ۱: اندازه‌گیری وسعت جمع شدگی زخم به روش پلانیمتری

نتایج

ارزیابی کمی

نتایج تغییرات متغیرهای بافتی

تفاوت معنی‌داری میان گروه‌ها از نظر تعداد سلول‌های تک هسته‌ای در روز ۷ و ۱۴ وجود نداشت، اما در روز ۲۱ تفاوت معنی‌داری مشاهده شد ($P < 0/05$). گروه کنترل اسرین در روز ۲۱، در مقایسه با گروه کنترل سالین و گروه آزمایش (پماد اسرین محتوی عصاره‌ی دانه‌ی گرده) به طور معنی‌داری دارای تعداد سلول‌های تک هسته‌ای بیشتری بود ($P < 0/05$). در روز ۲۱، تعداد سلول‌های تک هسته‌ای کنترل سالین به طور معنی‌داری نسبت به گروه آزمایش بیشتر بود ($P < 0/05$). میانگین متغیرهای تعداد سلول‌های پلی‌مورف بین سه گروه در روز ۷ اختلاف معنی‌داری نداشت. ولی این اختلاف در روزهای ۱۴ ($P < 0/05$) و ۲۱ ($P < 0/001$) معنی‌دار بود و کاهش معنی‌دار میانگین تعداد سلول‌های پلی‌مورف گروه آزمایش در روز ۱۴ با گروه کنترل سالین مشاهده گردید ($P < 0/05$). میانگین تعداد سلول‌های پلی‌مورف در روز ۲۱ گروه‌های کنترل سالین و اسرین بیشتر از گروه

زیرگروه ۷ و ۱۴ و ۲۱ روز پس از جراحی تقسیم شدند). پس از خاتمه هر دوره‌ی درمانی در هر گروه، موش‌ها با استفاده از اتر آسان‌کشی گردیده و از موضع زخم به همراه ۰/۵ سانتی‌متر از پوست اطراف، برداشته شد و در فرمالین ۱۰ درصد نگهداری و به آزمایشگاه هیستوپاتولوژی ارسال شد. در گروه‌های کنترل اسرین و آزمایش، کلیه‌ی عملیات انجام شده و مدت زمان درمان همان بود که در گروه کنترل سالین صورت گرفت با این تفاوت که درمان به ترتیب با اسرین و پایه‌ی پماد اسرین محتوی عصاره‌ی دانه‌ی گرده انجام شد. حجم مصرفی سرم فیزیولوژی به گونه‌ای بود تا موضع زخم از آلودگی‌های احتمالی پاک‌سازی شود. همچنین حجم یکسانی از اسرین و اسرین محتوی دانه‌ی گرده استفاده می‌شد و به صورت لایه‌ای نازک تمامی موضع زخم را می‌پوشاند. نمونه‌گیری نیز به همان روش دو گروه قبل صورت پذیرفت. محاسبه‌ی وسعت جمع‌شدگی زخم^۱ در گروه‌های سه‌گانه با عکس‌برداری به روش پلانیمتری^۲ روزانه انجام شد (تصویر ۱). نمونه‌های ارسال شده به آزمایشگاه پاتولوژی، پس از رنگ‌آمیزی به روش هماتوکسیلین - ائوزین، مورد ارزیابی کیفی و کمی قرار گرفتند. در ارزیابی کیفی با استفاده از لنز شیئی به صورت تصادفی و تعداد ۱۰ میدان میکروسکوپی از مرکز زخم، (۵ شان در جهت چپ و ۵ شان در جهت راست) انتخاب شده و تعداد سلول‌های آماسی تک هسته‌ای^۳، تعداد سلول‌های آماسی پلی‌مورف^۴، تعداد فیروبلاست‌ها و تعداد عروق تازه تشکیل شمارش گردید. پس از جمع‌آوری داده‌ها، برای مقایسه‌ی هر گروه در سه زمان مختلف از آنالیز واریانس یک‌طرفه^۵ و به منظور مقایسه‌ی میانگین‌ها در گروه‌ها و زمان‌های مختلف از آزمون تکمیلی LSD در نسخه ۱۶ نرم‌افزار SPSS استفاده شد. مقادیر $P < 0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

- 1- Contraction
- 2- planimetric
- 3- Mononuclear Cell (MNC)
- 4- Polymorphonuclear Cell (PMNS)
- 5- ANOVA

زمان‌های مورد بررسی نیز روند کاهش سلول‌های تک هسته‌ای در گروه تیمار معنی‌دار بود ($P < 0/001$). به گونه‌ای که این نوسانات در روز ۷ با روز ۱۴ و ۲۱ کاهش معنی‌داری را نشان داد ($P < 0/001$). در مورد متغیر سلول‌های چند هسته‌ای (پلی‌مورف)، نوسانات مقادیر سلول‌های پلی‌مورف در هر سه گروه در طول زمان بررسی از نظر آماری روند کاهش معنی‌داری را نشان داد ($P < 0/001$) که در گروه‌های کنترل اسرین، کنترل سالی‌ن و تیمار، روز ۷ با روز ۱۴ و ۲۱ تفاوت معنی‌دار بود ($P < 0/001$). در مورد نوسانات تعداد فیبروبلاست مشخص گردید در گروه‌های کنترل اسرین، کنترل سالی‌ن و آزمایش اختلاف معنی‌دار است ($P < 0/001$). که در خصوص گروه کنترل اسرین روز ۷ با روز ۱۴ ($P < 0/001$)، روز ۷ با روز ۲۱ ($P < 0/05$) و روز ۱۴ با روز ۲۱ اختلاف معنی‌دار بود ($P < 0/001$). گروه کنترل سالی‌ن تفاوت معنی‌داری را بین روزهای ۷ با ۲۱ و ۱۴ با ۲۱ نشان داد ($P < 0/001$) و در مورد گروه آزمایش نیز نوسانات فیبروبلاست روز ۷ با روز ۱۴ و ۲۱ تفاوت معنی‌دار بود ($P < 0/001$). در مورد نوسانات میزان عروق-زایی، گروه کنترل اسرین، کنترل سالی‌ن و آزمایش در طول زمان بررسی از نظر آماری معنی‌دار بود ($P < 0/001$). بدین نحو که این نوسانات در گروه کنترل اسرین، کنترل سالی‌ن و آزمایش تغییرات روز ۷ با روز ۱۴ و ۲۱ اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($P < 0/001$). میانگین \pm خطای معیار فاکتورهای التهابی و وضعیت معنی‌داری آن‌ها در سه گروه کنترل اسرین، کنترل سالی‌ن و آزمایش در سه زمان آزمایش در جدول ۱ نشان داده شده است.

آزمایش بود ($P < 0/001$). در مقایسه‌ی میانگین تعداد فیبروبلاست بین سه گروه در روزهای ۷ و ۱۴ و ۲۱ تفاوت معنی‌داری مشاهده شد ($P < 0/001$). تعداد سلول-های فیبروبلاست گروه کنترل سالی‌ن در روز ۷ به طور معنی‌داری کم‌تر از گروه کنترل اسرین و گروه آزمایش بود ($P < 0/001$). همچنین میانگین تعداد این سلول‌ها در روز ۱۴ گروه کنترل اسرین و گروه کنترل سالی‌ن با گروه آزمایش افزایش معنی‌داری داشت ($P < 0/001$). در روز ۲۱ میانگین تعداد سلول‌ها در گروه کنترل اسرین در مقایسه با گروه کنترل سالی‌ن و آزمایش و مقایسه بین گروه کنترل سالی‌ن با گروه آزمایش افزایش معنی‌داری داشت ($P < 0/001$). اختلاف معنی‌داری بین میانگین تشکیل عروق بین سه گروه در روز ۷ مشاهده نگردید. میانگین تشکیل عروق در روز ۱۴ و ۲۱ بین سه گروه اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($P < 0/001$). در روز ۱۴ گروه کنترل اسرین در مقایسه با گروه کنترل سالی‌ن و گروه آزمایش عروق‌زایی بیش‌تری داشت ($P < 0/001$). همچنین در خصوص مقایسه‌ی بین گروه کنترل سالی‌ن با گروه کنترل اسرین و گروه آزمایش در روز ۲۱ تفاوت معنی‌داری مشاهده شد ($P < 0/001$).

مقادیر سلول‌های تک هسته‌ای در طول زمان بررسی دچار کاهش معنی‌دار شد ($P < 0/001$) که در گروه کنترل اسرین در طول زمان بررسی از نظر آماری معنی‌دار بود ($P < 0/001$). در مقایسه‌ی بین روزهای این گروه، مشخص شد که روز ۷ با روز ۱۴ و ۲۱ دارای تفاوت معنی‌دار است ($P < 0/05$). برای گروه کنترل سالی‌ن این تفاوت‌ها مربوط به مقایسه‌ی روز ۷ با ۱۴ و روز ۱۴ با ۲۱ معنی‌دار بود ($P < 0/05$). در مورد گروه آزمایش در طول

جدول ۱: میانگین \pm خطای معیار فاکتورهای التهابی در سه گروه کنترل سالین (C)، کنترل اسرین (N.T) و آزمایش (T) در سه زمان آزمایش

Revascularization	Fibroblast	Polymorphs	Mononuclear	فاکتور	
				روز	گروه
$11/2 \pm 1/81$ $11/6 \pm 1/69$ $14 \pm 3/41$	$\alpha \beta 22/95 \pm 3/87$ $52/25 \pm 6$ $53/55 \pm 631$	$295/5 \pm 95$ $212/4 \pm 66/21$ $146/5 \pm 43/52$	$8/45 \pm 0/92$ $36 \pm 11/11$ $24/65 \pm 5/57$	C	7
				N.T	
				T	
$\alpha 1/25 \pm 0/18$ $\beta^* 1/3 \pm 0/3$ $\alpha 0/05 \pm 0/05$	$\beta 53/7 \pm 3/41$ $\beta 54/6 \pm 5/46$ $\alpha^* 6/7 \pm 2/24$	$\beta 8/3 \pm 0/74$ $18/7 \pm 5/7$ $* 5 \pm 0/66$	$6/3 \pm 0/26$ $8/45 \pm 3/19$ $3/5 \pm 0/59$	C	14
				N.T	
				T	
$\alpha \beta 4/3 \pm 0/26$ $* 0/4 \pm 0/28$ $*$	$\alpha \beta 11/55 \pm 0/42$ $\beta^* 20/12 \pm 0/68$ $\alpha^* 4 \pm 1/47$	$\beta 5/55 \pm 0/15$ $\beta 5/6 \pm 0/16$ $\alpha^* 0/72 \pm 0/17$	$\beta 4/5 \pm 0/37$ $\beta^* 9/32 \pm 0/94$ $* 2/12 \pm 0/26$	C	21
				N.T	
				T	

* تفاوت معنی دار با گروه کنترل سالین در هر روز $P < 0/05$.

α تفاوت معنی دار با گروه کنترل اسرین در هر روز $P < 0/05$.

β تفاوت معنی دار با گروه آزمایش در هر روز $P < 0/05$.

مقایسه‌ی میانگین متغیر انقباض زخم

نشان داد ($P < 0/001$). بدین نحو که در گروه‌های کنترل سالین، اسرین و آزمایش اختلاف میانگین انقباض روز هفتم با روز چهاردهم و روز هفتم با روز ۲۱ معنی دار بود ($P < 0/001$). میانگین \pm انحراف معیار درصد انقباض زخم در سه گروه کنترل اسرین، کنترل سالین و آزمایش در سه زمان آزمایش در جدول ۲ نشان داده شده است.

در روز ۱۴ از نظر انقباض زخم تفاوت معنی دار بین گروه‌ها وجود داشت ($P < 0/001$). در روز ۱۴ مقادیر گروه کنترل سالین با گروه کنترل اسرین و گروه آزمایش به طور معنی داری کم‌تر بود ($P < 0/05$). اما در روز ۷ و ۲۱ تفاوت آماری معنی داری مشاهده نشد. درصد انقباض در سه گروه تحت بررسی در طول زمان، روند افزایشی معنی داری را

جدول ۲: میانگین \pm انحراف معیار درصد انقباض زخم در سه گروه کنترل سالین (C)، کنترل اسرین (N.T) و آزمایش (T) در سه زمان آزمایش

روز	گروه		
	۲۱	۱۴	۷
C	100 ± 00	$\alpha \beta 90/4 \pm 2/01$	$25/11 \pm 7/38$
N.T	100 ± 00	$* 95/6 \pm 1/28$	$42/33 \pm 6$
T	100 ± 00	$* 99/35 \pm 0/65$	$21/03 \pm 9/7$

* تفاوت معنی دار با گروه کنترل سالین در هر روز $P < 0/05$.

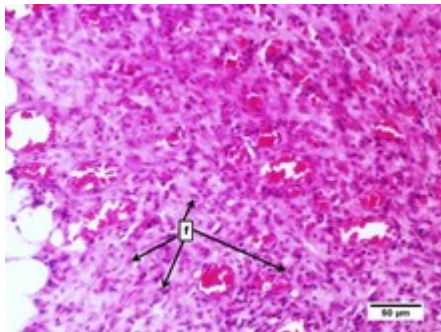
α تفاوت معنی دار با گروه کنترل اسرین در هر روز $P < 0/05$.

β تفاوت معنی دار با گروه آزمایش در هر روز $P < 0/05$.

نتایج ارزیابی کیفی

گروه شاهد ۷ روزه

در نمونه‌های تهیه شده از این گروه، آثار فیبروپلازی و رگ‌زایی به صورت خفیف (و در یک نمونه به صورت شدیدتر) مشاهده شد. ناحیه‌ی میانی زخم در همه‌ی نمونه‌ها با آگزودای آماسی حاد (نوتروفیل و فیبرین فراوان) اشغال شده بود. البته در یکی از نمونه‌ها شدت واکنش آماسی خفیف‌تر بود. تشکیل مجدد اپی‌تلیوم^۱ در این نمونه‌ها شروع شده و به استثنای یک نمونه (که تکمیل شده بود) در سایرین حدود یک سوم سطح زخم از طرفین را پوشانده بود. دلمه در سطح زخم در این گروه به صورت ثابت مشاهده شد (تصویر ۲).



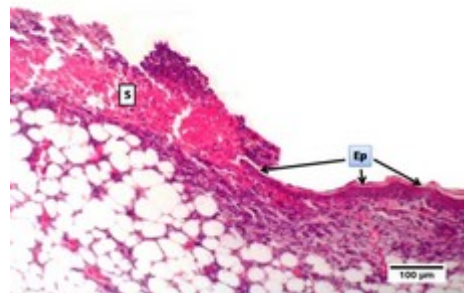
تصویر ۳: بافت جوانه‌ای حاوی تعداد زیادی رگ خونی و فیبروبلاست (f) در بخشی از زخم یکی از موش‌های گروه کنترل اسرین در روز ۷. (رنگ‌آمیزی H&E).

گروه درمان ۷ روزه

در این گروه نشانه‌هایی کم و بیش مشابه گروه قبل مشاهده شد.

گروه شاهد ۱۴ روزه

بافت جوانه‌ی گوشتی در این نمونه‌ها بالغ شده و از تعداد عروق تازه تشکیل آن کاسته شده بود. واکنش آماسی در سطح زخم در همه‌ی نمونه‌ها به استثنای یکی به نحو محسوسی تخفیف یافته و تشکیل مجدد اپی‌تلیوم، تکمیل شده و سطح زخم را پوشانده بود. البته اپی‌تلیوم جدید ضخیم و فاقد زوائد اپی‌درمی^۲ بود (تصویر ۴). انقباض زخم در این گروه انجام شده و فرآیند بازآرایی^۳ نیز شروع شده بود.



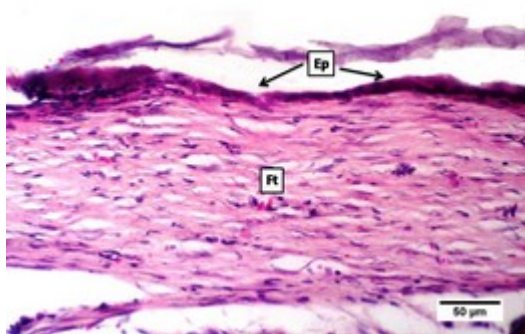
تصویر ۲: مقطع بخشی از زخم در یکی از موش‌های گروه کنترل اسرین در روز ۷. به دلمه (S) پوشاننده آن و نیز تشکیل مجدد اپی‌تلیوم (Ep) در قسمتی از زخم توجه شود (رنگ‌آمیزی H&E).

گروه کنترل ۷ روزه

در کف زخم‌های این گروه، آثار فیبروپلازی و رگ‌زایی پیشرفته (تصویر ۳) دیده شد که عموماً تا میانه‌ی زخم ادامه یافته بود. لایه‌ی سطحی زخم در هر چهار حیوان با نوتروفیل و فیبرین فراوان پر شده و فرآیند تشکیل مجدد اپی‌تلیوم حدود یک چهارم سطح زخم (از طرفین) را پوشانده بود. دلمه‌های نسبتاً ضخیم در سطح همه‌ی نمونه‌ها دیده شد.

2- Rete peg
3- Remodeling

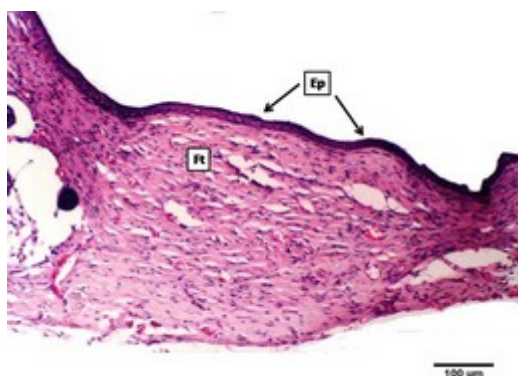
1- Re-epithelialization



تصویر ۵: پیشرفت روند بازآرایی بافت پیوندی (Ft) با منظم شدن رشته‌ها در یکی از موش‌های گروه کنترل سالین در روز ۲۱. بافت پوششی (Ep) علی‌رغم کاهش قطر ولی فاقد زوائد اپی‌درمی است (رنگ‌آمیزی H&E).

گروه کنترل ۲۱ روزه

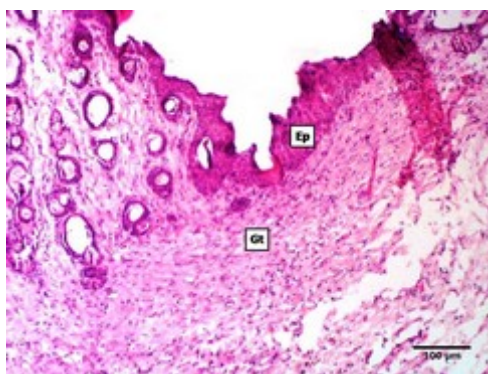
کم و بیش مشابه گروه قبل (تصویر ۶). علی‌رغم کاهش تعداد عروق تازه تشکیل در بافت جوشگاه تعداد فیبروبلاست‌ها همچنان قابل توجه بود.



تصویر ۶: پیشرفت روند بازآرایی بافت پیوندی (Ft) با منظم شدن رشته‌ها در یکی از موش‌های گروه کنترل اسرین در روز ۲۱. البته بافت پوششی (Ep) فاقد زوائد اپی‌درمی است (رنگ‌آمیزی H&E).

گروه درمان ۲۱ روزه

در این گروه، بلوغ بافت جوشگاه و منظم شدن رشته‌های کولاژن به همراه ناپدید شدن تقریبی عروق تازه تشکیل و فیبروبلاست‌ها مشاهده گردید.



تصویر ۴: تکمیل نسبی روند ترمیم زخم به شکل بلوغ بافت جوانه‌ای (Gt) و پوشیده شدن سطح با بافت پوششی نسبتاً ضخیم (Ep) در یکی از موش‌های گروه کنترل سالین در روز ۱۴ (رنگ‌آمیزی H&E).

گروه کنترل ۱۴ روزه

مشاهدات میکروسکوپی این گروه کم و بیش مشابه نمونه‌های گروه قبل ارزیابی گردید. در یکی از نمونه‌های این گروه نیز واکنش آماسی متوسطی (بر خلاف سایرین) مشاهده گردید. همچنین زوائد اپی‌درمی در اپی‌تلیوم این نمونه‌ها مشاهده گردید.

گروه درمان ۱۴ روزه

پیشرفت فرآیند بازآرایی و نیز تشکیل زوائد اپی‌درمی در زخم‌های این گروه مشاهده گردید. در یکی از نمونه‌ها هنوز دلمه متصل به اپی‌تلیوم تازه تشکیل مشاهده گردید. در یکی از نمونه‌ها همچنین واکنش آماسی متوسط در سطح با سایرین مشاهده گردید.

گروه شاهد ۲۱ روزه

تکمیل تشکیل مجدد اپی‌تلیوم و پیشرفت فرآیند نظم‌دهی مجدد در این زخم‌ها دیده شد. البته اپی‌تلیوم تشکیل شده کماکان فاقد زوائد اپی‌درمی بوده (تصویر ۵) و تعداد اندکی عروق جدید در جوشگاه دیده می‌شد.

بحث

تفاوت‌های بین سلول‌های شمارش شده در این مطالعه، می‌تواند دلالت بر تسریع روند التیام در اثر پماد آسیرین و پماد آسیرین محتوی عصاره‌ی دانه‌ی گرده باشد، زیرا هر چه تعداد سلول‌های التهابی بیش‌تر باشد حکایت از تسریع روند التیام زخم است (Kumar et al. 2005). همچنین روند التیام رابطه‌ی معکوس با تعداد سلول‌های چند هسته‌ای دارد (Kumar et al. 2005) که با یافته‌های حاصل از این مطالعه هم‌خوانی دارد و مبین اثربخشی عصاره‌ی به کار رفته می‌باشد. پس از ۱۴ روز درمان با عصاره‌ی لوئی، آثار ترمیم در زخم‌ها با کاهش در سطح زخم و افزایش انقباض ۹۹ درصدی در روز ۱۴ و ۱۰۰ درصدی در روز ۲۱ نسبت به روز ۷ مشاهده شد که شاید این نتایج بتواند در پاسخ به اثر بخشی اسیدهای آمینه‌ی موجود در عصاره‌ی گرده‌ی گیاه لوئی باشد (Declair 1999). در بررسی ماکروسکوپی زخم‌های تحت درمان با پماد محتوی عصاره، تولید بافت گرانوله و انقباض لبه‌ی خارجی زخم مشخص بود. در موضع منقبض شده‌ی زخم، سلول‌های میوفیبروبلاست نقش مهمی در بسته شدن زخم و نزدیک کردن لبه‌های زخم دارند (Corsi et al. 1994). نتایج نشان می‌دهد که درمان زخم با عصاره‌ی لوئی باعث چینش سلول‌های میوفیبروبلاست در نواحی زخم‌های درمان شده می‌شود. این سلول‌ها در سنتز ماتریکس شدیداً فعال بوده و سازمان‌یابی کمی را در حاشیه‌ی زخم نشان می‌دهند (Corsi et al. 1994, Declair et al. 1998). ترمیم زخم گذر از یک سری وقایع منظم است که سبب تشکیل تمامیت بافت صدمه دیده می‌گردد. ترمیم زخم سبب می‌شود تا بافت‌های صدمه دیده از تهاجم مواد بیماری‌زا محافظت شده و موجبات بازسازی بافت صدمه دیده فراهم شود. فازهای متفاوتی در ترمیم زخم دخیل می‌باشند، که شامل، فازهای التهابی، جوانه‌ی گوشتی، تشکیل و تزاید بافت فیبروبلاستی، تشکیل عروقی خونی جدید، جمع شدن زخم و تشکیل بافت

اپی‌تلیال است (Falanga 2005). فرایندهای ترمیم زخم از طریق استفاده از گیاهان و مواد موجود در طبیعت که دارای ترکیباتی از قبیل فلاونوئیدها، آلکالوئیدها، تانن‌ها و سایر بیوملکول‌ها است، صورت می‌گیرد. این عوامل اغلب بر یک فاز از فرایند ترمیم و یا بیش‌تر مؤثرند. خواص ترمیمی صبر زرد^۱ (Chithra et al. 1998) سنتلا آسیاتیکا^۲ (Shukla et al. 1999) تریداکس پروکومین^۳ (Sidhu et al. 1998) و کورکومین^۴ (Udupa et al. 1995) گزارش شده و از طریق مطالعات تجربی بر روی حیوانات مختلف به اثبات رسیده است. دانه‌های گرده‌ی اندام نر گیاه لوئی محتوی انواع مختلفی از فلاونوئیدها، تانن‌ها، ویتامین‌های E، C و A، اسیدهای آمینه‌ی آزاد و عناصر متنوع می‌باشد. در هر حال سودمندی اثر فلاون موجود در این گیاه بر ترمیم زخم پوست دست، به اثبات رسیده است (Gupta et al. 2006). ضمن این که باید گفت که این اثر به صورت افزایش معنی‌دار در میزان انقباض و جمع‌شدگی زخم، افزایش تشکیل بافت اپی‌تلیال، افزایش در هیدروکسی پرولین و هگزوزامین مشخص شد (Gupta et al. 2006). هیدروکسی پرولین، جزء اصلی سازنده‌ی کلاژن در موضع زخم می‌باشد. کلاژن نه تنها سبب استحکام و یکپارچگی ماتریکس بافت می‌شود بلکه نقش پایداری حیاتی و اپی‌تلیالیزیشن در فاز انتهایی ترمیم زخم را دارد. افزایش هگزوزامین سبب پایداری و ثبات ملکول‌های کلاژن از طریق افزایش فعل و انفعالات الکترواستاتیک (در بارهای الکتریکی ساکن) و یونی می‌شود (Clark 1996). درجه‌ی بیش‌تری از اپی‌تلیالیزیشن و تعداد فیبروبلاست‌ها در موضع زخم‌های درمان شده با عصاره‌ی گرده در روزهای هفتم و چهاردهم و سپس کاهش آن در روز بیست یکم مشاهده شد. اپی‌تلیالیزیشن بیش‌تر و قرار گرفتن در مرحله‌ی بلوغ، گواه بر این مدعا

1- *Aloe vera*
2- *Centella asiatica*
3- *Tridax procumbens*
4- *Curcumin*

کاروتنوئیدها نیز دانست (Akkol et al. 2011). در خصوص میزان مواد آنتی‌اکسیدانی و لیپید پراکسید معلوم شده که فلاون موجود در سنجد تلخ دارای فعالیت آنتی-اکسیدانی است که به جلوگیری از بروز واکنش‌های اکسیداتیو صدمه زنده به بافت کمک می‌کند و باعث ارتقاء پروسه‌ی ترمیم می‌شود (Gupta et al. 2005). زخم‌های درمان شده با فلاون افزایش را در گلوکاتیون که یک آنتی‌اکسیدان است و اسید اسکوربیک نشان می‌دهند. چنین مشاهده شده است که افزایش میزان این دو در موضع به طور تقریبی پروسه‌ی ترمیم را ارتقاء می‌بخشد (Xing et al. 2002). اسید اسکوربیک یک نقش تأیید شده در متابولیسم کلاژن دارد. علاوه بر این، اسید اسکوربیک محرکی در عمل نسخه‌برداری از ژن کلاژن، میزان mRNA کلاژن و تولید کلاژن در فیبروبلاست‌های کشت شده‌ی انسانی است (Chojkier et al. 1989). با توجه به جذب مواد معدنی از خاک توسط گیاه، مانند منگنز، آهن، مس و روی، کاربرد گیاهان در ترمیم زخم ممکن است از طریق تأمین عناصر لازم برای تشکیل آنزیم‌های مورد نیاز باشد. در واقع این عناصر محرک سنتز آنزیم‌هایی هستند که در پروسه‌ی ترمیم زخم دخالت دارند (Duke and Ayensu 1985). پایان سخن این که کاربرد موضعی عصاره‌ی دانه‌ی گرده لویی تأثیری مثبت بر مراحل متفاوت ترمیم زخم دارد، و بنابراین شاید نقش سودمندی را در ترمیم زخم عهده‌دار باشد.

است که فلاون موجود در عصاره‌ی گرده است که موجب این واقعه‌ی ایده‌آل شده است، زیرا که فلاون ماده‌ای است که دارای اثر ترمیمی مؤثری در زخم است (Gupta et al. 2006). در مطالعه‌ی حاضر همان‌گونه که ذکر شد کاهش تعداد مقاطع عروق خونی در گروه آزمایش که مرحله‌ی ایده‌آل از نظر روند بازسازی و سازمان‌یابی کلاژن در موضع زخم می‌باشد دیده شد که احتمالاً به دلیل حضور فلاوین در عصاره‌ی دانه‌ی گرده می‌باشد (Gupta et al. 2006). در مطالعه‌ی، اثربخشی یکی از گیاهان خانواده‌ی تیفا بر ترمیم زخم تجربی در موش سوری و صحرائی اثبات شده است (Akkol et al. 2011). گیاهان این خانواده حاوی مقادیر متنوعی از پلی‌ساکاریدها هستند. از طرف دیگر پلی‌ساکاریدهای گیاهان متفاوت بر ترمیم زخم مؤثر می‌باشند (Akkol et al. 2011). رادیکال‌های آزاد تولید شده در موضع صدمه دیده سبب زیان در پروسه‌ی ترمیم از طریق صدمه به غشای سلولی، نوکلئوتید، پروتئین‌ها و لیپیدها می‌شود. از آنتی‌اکسیدانهایی مانند ماده‌ی رنگی زردچوبه، ویتامین E و غیره نامبرده شده که خاصیت آنتی‌اکسیدانی آنان در بافت‌های صدمه دیده به اثبات رسیده است (Pascoe et al. 1987, Selvam et al. 1995). موضوع کاربرد آنتی‌اکسیدان‌ها در ترمیم زخم و ارتقاء پروسه‌ی ترمیم زخم به اثبات رسیده است (Gomathi et al. 2003, Khanna et al. 2002). بسیاری از عصاره‌ی گیاهان و گیاهان طبی توان بالفعل آنتی‌اکسیدانی دارند. فلاونوئیدها ترکیبات اصلی بسیاری از عصاره‌ی گیاهان می‌باشد. فلاونوئیدها خنثی کننده‌ی قوی در مقابل رادیکال‌های آزاد هستند (De-Groot and Rauen 1998) ثابت شده است که ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاهی مربوط به حضور ویتامین‌های C و E، کاروتنوئید و فلاونوئیدهای آن است (Xing et al. 2002). با توجه به اثر کاروتنوئیدها در افزایش قدرت ترمیم زخم، شاید بتوان فعالیت ترمیم زخمی ناشی از این گیاه را در ارتباط با

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله، مراتب تشکر و قدردانی خود را از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز برای تأمین هزینه‌های این مطالعه ابراز می‌نمایند.

منابع

- Akkol, E.K.; Süntar, I.; Keles, H. and Yesilada, E. (2011). The potential role of female flowers inflorescence of *Typha domingensis* Pers. in wound management. *Journal of Ethnopharmacology*, 133(3): 1027-1032.
- Chithra, P.; Sajithlal, G.B. and Chandrakasan, G. (1998). Influence of *Aloe Vera* on the glycosamino-glycans in the matrix of healing dermal wounds in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 59: 179-186.
- Chojkier, M.; Houglum, K.; Solis-Herruzo, J. and Brenner, D.A. (1989). Stimulation of collagen gene expression by ascorbic acid in cultured human fibroblasts: a role for lipid peroxidation. *The Journal of Biological Chemistry*, 264: 16957-16962.
- Clark, R.A. (1996). Wound repair: Overview and general considerations. In: R.A. Clark and P.M. Henson (eds). *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*. Plenum Press, New York. Pp: 102-109.
- Corsi, R.C.C.; Corsi, P.R.; Pirana, S.; Muraco, F.A.E. and Jorge, D. (1994). Wound healing: literature review. *Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery*, 84: 17-24.
- Declair, V. (1999). The importance of growth factors in wound healing. *Ostomy/Wound Management*, 45: 64-72.
- Declair, V.; Carmona, M.P. and Cruz, J.A. (1998). Essential fatty acids (EFAs) cell protectors of aggressive mechanisms of hypoxic injury. *Journal of Nursing in Current Dermis*, 4: 15-17.
- De-Groot, H. and Rauen, U. (1998). Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 12: 249-255.
- Duke, J.A. and Ayensu, E.S. (1985). *Medicinal plants of China*. Algonac, MI: Reference Publications, 2: 544.
- Dukhanina, I.V.; Airapetova, A.Y.; Lazaryan, G.D. and Vasilenko, Y.K. (2006). Quantitative determination of free amino acids in pollen. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 40(2): 82-84.
- Falanga, V. (2005). Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *The Lancet*, 366 (9498), 1736-1743.
- Gomathi, K.; Gopinath, D.; Rafiuddin Ahmed, M. and Jayakumar, R. (2003). Quercetin incorporated collagen matrices for dermal wound healing processes in rats. *Biomaterials*, 24: 2767-2772.
- Gupta, A.; Kumar, A.; Pal, K.; Singh, V.; Banerjee, P.K. and Sawhney, R.C. (2006). Influence of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) Flavone on dermal wound healing in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 290:193-198.
- Gupta, A.; Kumar, R.; Pal, K.; Banerjee, P.K. and Sawhney, R.C. (2005). A preclinical study of the effects of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L. leaf extract on cutaneous wound healing in albino rats. *The International Journal of Lower Extremity Wounds*, 4: 88-92.
- Khanna, S.; Venojarvi, M.; Roy, S.; Sharma, N.; Trikha, P.; Bagchi, D. et al. (2002). Dermal wound healing properties of redox-active grape seed proanthocyanidins. *Free Radical Biology and Medicine*, 33: 1089-1096.
- Kucera, M.; Barna, M.; Horacek, O.; Kovarikova, J. and Kucera, A. (2004). Efficacy and safety of topically applied Symphytum herb extract cream in the treatment of ankle distortion: Results of a randomized controlled clinical double-blind study. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 154(21-22): 498-507.
- Kumar, V.; Abbas, A.; Fausto, N.; Robbins and Gotran (2005). *Pathologic basis of disease*, 7th ed, Philadelphia; Elsevier, Pp: 78-118.
- Pascoe, G.A.; Fariss, M.W.; Olafsdottir, K. and Reed, D.J. (1987). A role of vitamin E in protection against cell injury: Maintenance of intracellular glutathione precursor and biosynthesis. *European Journal of Biochemistry*, 166: 241-247.
- Selvam, R.; Sumramanian, L.; Gayathri, R. and Angayarkanni, N. (1995). The antioxidant activity of turmeric (*Curcuma longa*). *Journal of Ethnopharmacology*, 47: 59-67.
- Shukla, A.; Rasik, A.M.; Jain, G.K.; Shanker, R.; Kulshrestha, D.K. and Dawan, B.N. (1999). In

- vitro and in vivo wound healing activity of asiaticoside isolated from *Centella asiatica*. *Journal of Ethnopharmacology*, 65: 1-11.
- Sidhu, G.S.; Singh, A.K.; Thaloor, D.; Banaudha, K.K.; Paitnaik, G.K.; Srimal, R.C. and Maheshwari, R.K. (1998). Enhancement of wound healing by curcumin in animals. *Wound Repair and Regeneration*, 6: 167-177.
- Sukhdev, S.H.; Suman, P.S.K.; Gennaro, L. and Dev DR. (2008). Extraction technologies for medicinal and aromatic plants. *International Center for Science and High Technology*, 196-198.
- Tranquilli, W.J.; Thurmon, J.C. and Grimm, K.A. (2013). *Lumb & Jones' Veterinary Anesthesia and Analgesia*. 5th ed. Oxford, Blackwell, Pp: 83, 291-292.
- Udupa, A.L.; Kulkurni, D.R. and Udupa, S.L. (1995). Effect of *Tridax procumbens* extracts on wound healing. *International Journal of Pharmacognosy*, 33: 37-40.
- Varpe, S.S.; Juvekar, A.R.; Bidikar, M.P. and Juvekar, P.R. (2012). Evaluation of anti-inflammatory activity of *Typha angustifolia* pollen grains extracts in experimental animals. *Indian Journal of Pharmacology*, 44(6): 788-791.
- Xing, J.; Yang, B.; Dong, Y.; Wang, B.; Wang, J. and Kallio, H.P. (2002). Effects of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed and pulp oils on experimental models of gastric ulcer in rats. *Fitoterapia*, 73: 644-650.
- Yeung H.C. (1985). *Handbook of Chinese Herbs and Formulas*. Institute of Chinese Medicine, Los Angeles. Pp: 95-112.

Histopathologic evaluation of *Typha angustifolia* pollen extract on experimental full thickness wound healing in mice

Naddaf, H.¹; Esmaeilzadeh, S.²; Pourmehdi Borujeni, M.³ and Sabiza, S.⁴

Received: 01.09.2015

Accepted: 23.04.2016

Abstract

Thousands of years before the plants have been used as a wound healing material. *Typha angustifolia* is native plant in wetland environments such as Khuzestan, Iran. It is available in abundance and extraction. The aim of this study was to evaluate the effect of *Typha angustifolia* pollen extract on experimental full thickness wound healing in mice. Thirty six mice were equally divided into 3 groups: the control group of saline, control group of eucerin and the treatment group (eucerin containing pollen extract), respectively. After anesthesia, a piece of 0.5 * 0.5 cm in size of skin was removed from the back of the neck and between the shoulders. The surgical site was treated with topical saline sterile. This treatment procedure was done for all 12 mice in each group and after each group received its specific treatment. Each of the groups was also divided into 3 subgroups (group 7, 14 and 21 days). At the end of each period in each group and after euthanasia of each mouse, wounded skin removed with 0.5 cm of surrounding skin and sent to histopathology laboratory. At the end of the study, mononuclear cells, polymorphonuclear, fibroblasts and angiogenesis was lower than other groups in the treatment group ($p < 0.001$). Despite being less wound contraction in the treatment group, the process was more than other groups in day 14 ($p < 0.001$). While in the treatment group, the process of wound contraction was less severe at the beginning, it was more strongly than the other groups in the following ($p < 0.001$). Complete wound healing was observed in all groups at day 21. In this study, the application of *Typha angustifolia* pollen extract had a positive effect on wound healing process in mice and therefore it might be effective in wound healing.

Key words: Histopathology, Wound healing, *Typha angustifolia*, Mice

1- Associate Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

2- Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

3- Associate Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

4- DVSc Graduated of Veterinary Surgery, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Corresponding Author: Naddaf, H., E-mail: hdnaddaf@scu.ac.ir